

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

И.Л. Комарицкий¹, О.М. Хишова¹, Н.Ю. Бевз², В.А. Георгиянц²

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМЛОДИПИНА БЕСИЛАТА МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

²Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

В статье приведены результаты проведенной разработки и валидации методики количественного определения амлодипина бесилата методом спектрофотометрии. Изучены валидационные характеристики: правильность, сходимость, линейность и прецизионность.

Ключевые слова: амлодипина бесилат, валидация, количественное определение, блокаторы кальциевых каналов, спектрофотометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы в последние годы занимают одно из первых мест в мире, поэтому количество кардиологических лекарственных средств (ЛС) значительно увеличивается. Многочисленные исследования [1–3] свидетельствуют о том, что при помощи регулярной терапии гипотензивными ЛС удается на 40–45% снизить летальность вследствие мозгового инсульта и на 15–20% от инфаркта миокарда. Для эффективного и безопасного использования ЛС этой группы необходимо повышать требования к контролю их качества путем разработки новых и усовершенствования существующих методов фармацевтического анализа.

Количественное определение амлодипина бесилата в субстанции Британская фармакопея рекомендует проводить гармонизированным с Европейской фармакопеей методом жидкостной хроматографии [4,5].

В лекарственных формах количественное определение амлодипина бесилата проводят методом ВЭЖХ и экстракционно-спектрофотометрическим методом, который базируется на образовании окрашенных комплексов [6–8].

Целью настоящего исследования является анализ метрологических характеристик количественного спектрофотометрического определения амлодипина бесилата в таблетках и проведение валидации ана-

литической методики по методу стандарта в условиях контрольно-аналитической лаборатории.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проведен теоретический расчет критериев приемлемости методики анализа: максимально допустимая полная неопределенность методики, которая составляет $\Delta A_s = 2,4\%$, максимальная систематическая ошибка $\max \delta = 0,77\%$. Вклад плацебо в суммарную величину фонового поглощения является незначимым и им можно пренебречь, если выполняется соотношение $\delta_{\text{exc}} \leq 0,75\%$, критическое значение $RSD_{\text{exc}}\% = 1,27$, критическое значение индекса корреляции $-R_c = 0,9912$, критическое значение практической неопределенности свободного члена линейной зависимости $-a = 3,84$.

При проведении исследований использовали субстанцию амлодипина бесилата серии № АВ0401013.

Аналізу подвергали таблетки «Амлодипин-Здоровье», серия № 20113, производитель ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье»; таблетки «Амлодипин», серия № 10213, производитель ЧАО «Технолог»; таблетки «Амлодипин-Фармак», серия № 150313, производитель ОАО «Фармак».

Аналитическое оборудование: спектрофотометр Evolution 60S; весы AXIS ANG200. Для работы использовали реактивы, мерную посуду класса А (перво-

го класса) и вспомогательные вещества, которые отвечали требованиям Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) [9].

Количественное определение амлодипина бесилата в таблетках методом стандарта проводили при помощи измерения оптических плотностей раствора исследуемого образца (A_1) и раствора сравнения (A_0) с концентрацией C_0 . Содержание амлодипина (X) в одной таблетке в миллиграммах рассчитывали по формуле

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot 0,721}{A_0 \cdot m_1} \cdot \frac{P}{100},$$

где m_0 – масса навески ЛС, в мг;

m_1 – масса навески стандартного образца (СО) амлодипина бесилата, в мг;

P – содержание амлодипина бесилата в СО амлодипина бесилата в процентах;

0,721 – коэффициент перерасчета амлодипина бесилата на амлодипин;

b – средняя масса таблетки, в мг.

Измерения проводили с использованием кюветы толщиной 1 см при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ в одинаковых условиях с минимальным интервалом во времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во время проверки физико-химических свойств амлодипина бесилата было выяснено, что субстанция нерастворима в воде, в растворе натрия гидроксида возможно выпадение осадка амлодипина, а также возможно его взаимодействие со щелочью, с образованием соли аци-нитро производной. Поэтому альтернативным растворителем выбрали 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты, при предложенной пробоподготовке и концентрации действующего вещества $5 \cdot 10^{-5}$ г/мл обеспечивается оптимальная оптическая плотность в пределах 0,4–0,7, что существенно повышает точность исследования.

Была исследована робастность методики во времени (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты исследования робастности методики количественного определения амлодипина бесилата

Раствор	Время исследования стабильности nt, мин					Среднее	RSD _r , %	Δ_r , %	max δ , %
	0	15	30	45	60				
Исследуемый	0,629	0,627	0,626	0,626	0,626	0,627	0,208	0,362	0,77
Стандартный	0,628	0,629	0,628	0,627	0,628	0,628	0,113	0,196	

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о стабильности исследуемого и стандартного образцов во времени, что подтверждает правильность выбора растворителя.

Нами был проанализирован спектр поглощения амлодипина бесилата на участке от 200 до 400 нм, а также спектр плацебо (рисунок 1). Полученный спектр поглощения имеет максимумы при дли-

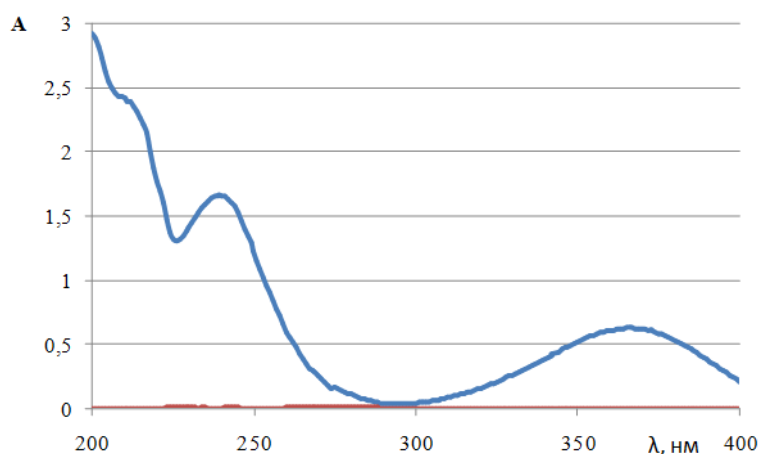


Рисунок 1 – Абсорбционный спектр поглощения стандартного образца (СО) амлодипина бесилата (1) и плацебо (2)

нах волн 240 нм и 366 нм, что отвечает аналитической длине волны, которую рекомендуют Европейская и Британская фармакопеи для идентификации субстанции амлодипина бесилата. Пик при длине волны 366 нм является более специфичным для амлодипина бесилата, поэтому мы выбрали его для проведения методики количественного определения. При длине волны 366 нм оптическая плотность раствора амлодипина бесилата в 0,01 М НСl с концентрацией 0,05 мг/мл составляет 0,629, что оптимально для проведения исследования.

Установлено, что влияние плацебо на суммарное поглощение ЛС составляет

$$\frac{A_{blank}}{A_{st}} \cdot 100 = \frac{0,002}{0,629} \cdot 100\% = 0,3\% \leq 0,75\%$$

Это значит, что фоновое поглощение является незначимым и методика характеризуется надлежащей специфичностью.

Оценку *линейной зависимости* проводили на всём диапазоне применения методики по методу стандарта. Изучали характер зависимости оптической плотности от концентрации, используя 9 модельных растворов для анализа с точными навесками концентраций: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 и 120% от номинальной.

Полученные результаты были статистически обработаны методом наименьших квадратов согласно требованиям ГФУ. Построение градуировочного графика проводили в нормализованных координатах (рис. 2). Для каждого из девяти растворов образца рассчитывали среднее значение оптической плотности (A_i). Полученные результаты обрабатывали методом наименьших квадратов для прямой $Y = b \cdot x + a$. Рассчитанные статистические величины b , S_b , a , S_a , S_r (остаточное стандартное отклонение) и r (коэффициент корреляции) приведены на рисунке 2 и в таблице 2.

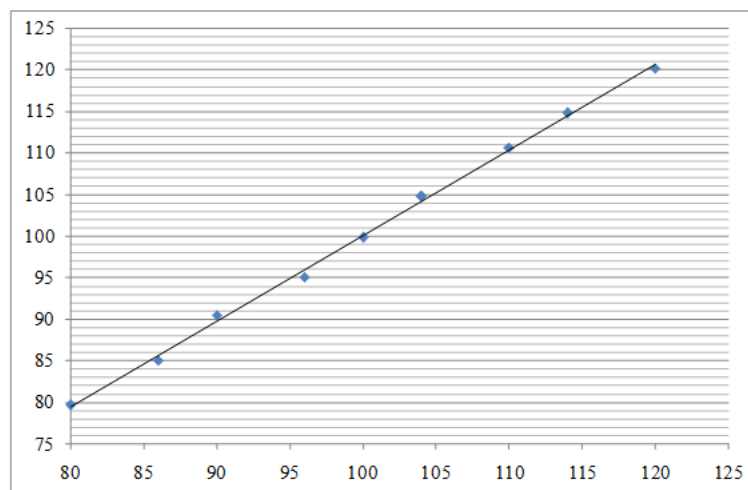


Рисунок 2 – Зависимость оптической плотности от концентрации амлодипина бесилата в нормализованных координатах

Требования к параметрам линейной зависимости в нашем случае выполняются на всем диапазоне применения методики (80 – 120%).

Для *проведения измерений и расчета* метрологической оценки *сходимости и правильности* методики было получено три значения оптических плотностей для раствора сравнения и 27 значений оптических плотностей для модельных растворов. Рассчитывали фактические величины ($X_{i\text{факт}}$), отношения средних значений оптических плотностей для каждого из

27 растворов к среднему значению оптической плотности раствора сравнения, получая величины $X_i\% = (C_i / C_{st}) \cdot 100\%$, $Y_i = (A_i / A_{st}) \cdot 100$, а также величину $Z_i = (Y_i / X_i) \cdot 100\%$, которая является найденной концентрацией в процентах к введенной. Результаты расчетов приведены в таблице 3.

Использование метода стандарта дает возможность нивелировать погрешность, поскольку пробоподготовка и измерение оптической плотности исследуемого раствора и раствора сравнения проводятся в одинаковых условиях, в той же кювете,

Таблица 2 – Параметры линейности

Растворы	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$(C_i/C_{st}), \%$	80,00	86,00	90,00	96,00	100,00	104,00	110,00	114,00	120,00
$(A_i/A_{st}), \%$	79,65	85,06	90,46	95,07	99,84	104,77	110,65	114,79	120,19

$$Y_i = 1,0307 \cdot X_i - 3,0169$$

Угловой коэффициент линейной зависимости b	1,03
s_b	0,0156
Свободный член линейной зависимости a	-3,01
s_a	1,57
Остаточное стандартное отклонение s_r	0,587
s_r/b	0,57
Коэффициент корреляции методики r	0,9992

Таблица 3 – Результаты анализа модельных растворов и их статистическая обработка

	Концентрации компонентов		
	Введено в % к концентрации раствора сравнения $X_i = (C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Найдено в % к концентрации раствора сравнения $Y_i = (A_i/A_{st}) \cdot 100\%$	Найдено в % к введенному $Z_i = (A_i/A_{st}) \cdot 100\% / (C_i/C_{st})$
1 раствор	80,0	79,6	99,6
2 раствор	86,0	85,1	98,9
3 раствор	90,0	90,5	100,5
4 раствор	96,0	95,1	99,0
5 раствор	100,0	99,8	99,8
6 раствор	104,0	104,8	100,7
7 раствор	110,0	110,6	100,6
8 раствор	114,0	114,8	100,7
9 раствор	120,0	120,2	100,2
Среднее, $X\%$			100,0
Относительное стандартное отклонение, $s_x\%$			0,708
Относительный доверительный интервал $\Delta\% = t(95\%, 8) \cdot s_x = 1,86$			1,3
Критическое значение для сходимости результатов $\Delta\% \leq$			2,4
Систематическая погрешность $\delta = X - 100 $			0
Критерий незначимости систематической погрешности 1) $\delta \leq \Delta/3 = 1,3158/3 = 0,4386$, если не выполняется 1), то $\delta \leq 1,3158$			Выполняется Выполняется
Общий вывод по методике:			Корректная

одинаково расположенной напротив той же компенсационной кюветы, на том же спектрофотометре.

Методика количественного определения.

Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой области методом стандарта.

Исследуемый раствор. К точной навеске порошка таблеток, эквивалентной 50 мг амлодипина, прибавляют 75 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной,

перемешивают 25 мин, доводят объем раствора 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной до 100,0 мл и фильтруют, отбрасывая первые 10,0 мл фильтрата. 10 мл фильтрата помещают в колбу вместимостью 100,0 мл и доводят до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной.

Раствор сравнения. 70,0 мг СО амлодипина бесилата растворяют в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной и доводят объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл, берут аликвоту 10,0

мл и переносят её в колбу вместимостью 100,0 мл, доводя до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной.

Компенсационный раствор. 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной.

Оптическую плотность исследуемого раствора и раствора сравнения измеряют при длине волны 366 нм относительно компенсационного раствора.

Рассчитывают содержание $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ в одной таблетке, в миллиграммах, в перерасчете на среднюю массу таблетки, исходя из заявленного содержания $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ в СО амлодипина бесилата.

Метрологические характеристики результатов количественного определения таблеток амлодипина бесилата разных производителей представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Метрологические характеристики результатов количественного определения таблеток амлодипина бесилата разных производителей

Производитель	μ , %	ν	\bar{x} , %	S^2	S	P, %	$t(P, \nu)$	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$, %
Здоровье	100	5	9,94	0,0016	0,0397	95	2,5706	0,046	0,4587
Фармак	100	5	9,94	0,0023	0,0477	95	2,5706	0,055	0,5518
Технолог	100	5	9,95	0,0008	0,0279	95	2,5706	0,032	0,3226

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В процессе разработки и валидации методики количественного определения таблеток амлодипина бесилата были изучены валидационные характеристики спектрофотометрической методики количественного определения методом стандарта амлодипина бесилата в таблетках: правильность, сходимость, линейность и прецизионность.

2. Метрологические характеристики методики не превышают критического значения погрешности (2,4%) и характеризуются качественными аналитическими показателями. Данная методика может быть корректно воспроизведена в условиях лабораторий.

3. Данная методика является корректной независимо от вспомогательных веществ, которые используются при изготовлении модельного раствора, и независимо от производителя.

SUMMARY

I.L. Komarytskiy, O.M. Hishova, N.Yu. Bevz, V.A. Georgiyants
DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMLODIPINE BESYLATE BY SPECTROPHOTOMETRY
This article presents the results of the validation method of quantitative determination of amlodipine besylate by spectrophotometry. Validation characteristics that were studied: accuracy, repeatability, linearity and precision.

Keywords: amlodipine besylate, validation, quantification, calcium channel blockers, spectrophotometry.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метелица, В.И. Справочник по клинической фармакологии сердечно-сосудистых лекарственных средств / В.И. Метелица. – 2-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во БИНОМ – СПб.: Невский диалект, 2002. – 926 с.
2. Белоусов, Ю.Б. Клиническая фармакология амлодипина (норваска) / Ю.Б. Белоусов, А.Н. Грацианская. - М.: «Универсиум Паблишинг», 1998. – 47с.
3. Contact Pharma. Top companies Report. – July/August. – 2003. – Vol. 5. – № 6. – P. 40.
4. British Pharmacopoeia. – London. The Stationary Office. – 2001. – Vol. 1-2. – 3199 p.
5. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2008. – 2416 p.
6. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry / M.D Malesuik [et al.] // J AOAC Int. – 2006. – Mar-Apr; 89 (2). – P. 359-364.
7. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC / Vajjanath G. Dongre [et al.] // J. Pharm. And Biomed. Anal. – 2008. – Vol. 46, issue 3. – P. 583–586.
8. Hanaa, M. Abdel-Wadood. Validated

spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets / M. Abdel-Wadood Hanaa, A. Mohamed Niveen, Ashraf M. Mahmoud // Spectrochimia Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2008. – Vol. 70, N. 3. – P. 564–570.

9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – Доповнення 2. – Харків: РІРЕГ. – 2008. – 608 с.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра промышленной технологии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8 (0212) 37-00-13,
Хишиова О.М.

Поступила 13.11.2013 г.